

А.Е. Тарасова, Т.М. Панкова, М.В. Старостина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Россия.

Введение

Микроглия играет важную роль в обеспечении защиты и поддержании гомеостаза головного и спинного мозга. В спокойном состоянии микроглиальные клетки имеют маленькое округлое тело и очень длинные, тонкие, с большим числом ветвлений, отростки (ветвящаяся микроглия). Отростки микроглиальных клеток образуют большое число контактов с другими глиальными клетками, нейронами, их аксонами и дендритами, что позволяет им быстро реагировать на возникающие изменения. Нарушение гомеостаза (травматическое повреждение, инсульты, проникновение токсинов, инфекция и т.п.) приводит к активации микроглиальных клеток. Сама клетка первично активированной микроглии увеличена, а отростки более короткие и толстые, в дальнейшем она может перейти в амебодную и фагоцитирующую формы. Первично активированную микроглию подразделяют на M1 или M2 типы. M1-микроглия является провоспалительной, продуцирует провоспалительные цито- и хемокины, в этих клетках активны NADPH-оксидаза и индуцибельная NO-синтаза. M2-микроглия содержит аргиназу 1 и секретирует противовоспалительные цитокины, ростовые факторы, нейротрофины. Таким образом, если M1 микроглия выступает в качестве провоцирующего нейровоспаление агента, то M2 – в качестве агента, разрешающего воспаление и способствующего восстановлению. Морфин, как и многие другие наркотики, способен вызывать стерильное нейровоспаление.

Цель исследования

Целью нашей работы являлся анализ влияния миелопептидов (МП) на состояние микроглиальных клеток в гиппокампе и зубчатой фации мышей с хронической зависимостью от морфина.

Методы

Зависимость от морфина у группы мышей получали инъекционным методом, еще 6 группам вводили морфин совместно с одним из МП, для анализа влияния собственно МП 6 группам животных вводили МП, контрольная группа мышей получала физиологический раствор. Анализ проводили на криостатных сагитальных срезах головного мозга (Рис.1), используя антитела: к кальций-связывающему белку Iba1 (общий маркер микроглии), к индуцибельной NO-синтазе (маркер M1-типа, iNOS), к аргиназе 1 (маркер M2-типа, ARG) и соответствующие вторичные антитела. Изображения областей гиппокампа CA1 и CA3 и зубчатой фации с прилегающим хилусом, полученные на конфокальном микроскопе LSM 780 NLO, анализировали, используя программное обеспечение ZEN software. Рассчитывали отношение активированных по M1 или M2-типу клеток микроглии к общему количеству микроглиальных клеток. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы StatSoft Statistica. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Активация микроглии по провоспалительному типу (M1) в гиппокампе и зубчатой фации мышей с хронической зависимостью от морфина. Микроглиальные клетки, активированные по M1 типу, определяли по колокализации антител к Iba1 и антител к индуцибельной NO-синтазе (Рис.2). Хроническая зависимость от морфина приводила к появлению большого числа клеток микроглии, активированных по M1 типу. Индуцибельная NO-синтаза локализована преимущественно в отростках и участках, прилежащих к клеточной мембране. В областях CA1 и CA3 гиппокампа активированная микроглия распределена достаточно равномерно во всех слоях – пирамидном, где находятся тела пирамидных нейронов, и прилежащих к ним слоях (stratum oriens, str. radiatum, str. lucidum, str. lacunosum-moleculare). В зубчатой фации и хилусе активированная микроглия идентифицируется в зоне гранулярных клеток, включая внутренний генеративный слой, молекулярном слое, содержащем волокна перфорантного пути и вставочные нейроны, в хилусе, где формируются пучки мистых волокон. Это совпадает с распределением спокойной микроглии в гиппокампе и зубчатой фации. В срезах контрольных животных встречались единичные активированные клетки, что, вероятно, объясняется локальными изменениями активности отдельных нейрональных связей.

Результаты и обсуждение

При совместном введении МП и морфина в ходе выработки хронической зависимости у животных количество микроглии M1- типа снижалось во всех исследованных областях гиппокампа. Введение миелопептидов в той же дозировке совместно с физиологическим раствором не вызвало активации микроглии по M1 типу. При подсчете относительного количества M1-микроглии учитывались только Iba1- и Iba1+iNOS – позитивные клетки, в которых можно было идентифицировать ядро. Полученные результаты подтвердили, что хроническая зависимость от морфина приводит к активации микроглии по провоспалительному типу. Совместное введение МП и морфина на стадии выработки хронической зависимости достоверно снижает количество микроглиальных клеток M1-типа. В то же время полученные значения относительного количества M1-активированной микроглии достоверно выше обнаруженных в структурах мозга животных контрольной группы. Исключением был эффект МП4, обнаруженный в области CA1 и зубчатой фации. Введение МП не приводило к появлению активированной M1-микроглии, то есть собственно МП не вызывали провоспалительной активации микроглиальных клеток (Рис.3). **Активация микроглии по противовоспалительному типу (M2) в гиппокампе и зубчатой фации мышей с хронической зависимостью от морфина.** Микроглию, активированную по M2-типу, определяли по колокализации антител к Iba1 и антител к аргиназе 1 (ARG) (Рис.4). Аргиназа 1 выявляется в цитоплазме микроглиальных клеток, но количество таких клеток в контроле относительно невелико. В зоне зубчатой фации ARG-позитивная микроглия выявляется в генеративном слое, где в зрелом мозге происходит образование новых гранулярных нейронов и глиальных клеток. Вероятно, это связано с тем, что продуцируемые M2-микроглией ростовые факторы и нейротрофины необходимы для нормального развития новых клеток. В срезах мозга мышей с хронической зависимостью от морфина количество ARG-позитивных клеток снижается, различия между зависимыми и контрольными животными были достоверны (Рис. 5). Данные по влиянию МП на активацию микроглии по M2-типу имели большой разброс, что не позволило в ряде случаев определить достоверность выявленных изменений. При совместном введении с морфином МП1 достоверно не изменял количество ARG-позитивной микроглии по сравнению с контролем, но введение только МП1 повышало количество микроглии, активированной по M2 типу (достоверные различия – в CA3, зубчатой фации и хилусе). При введении морфина с МП2 относительное количество микроглии M2-типа практически не отличалось от показателей у зависимых мышей. Введение только МП2 также не изменяло относительного количества M2-микроглии по сравнению с контролем. В срезах мозга животных, которым вводили морфин и МП4, во всех изученных структурах количество ARG-позитивной микроглии было достоверно выше, чем в срезах мозга мышей с хронической зависимостью от морфина. Введение морфина и МП5 так же, как и введение морфина, снижало относительное количество M2-микроглии структурах по сравнению со срезами контрольных животных. В то же время при введении только МП5 количество ARG-позитивной микроглии было достоверно выше, чем у зависимых животных в CA1 и зубчатой фации. В области CA1 совместное введение МП6 и морфина приводило к достоверному увеличению количества M2-микроглии по сравнению с этой областью гиппокампа у зависимых животных. (Рис.5)

Заключение

Таким образом, полученные нами данные показывают, что: экспериментальная хроническая зависимость от морфина у мышей приводит к активации микроглии по провоспалительному M1-типу в гиппокампе и зубчатой фации; миелопептиды не вызывали провоспалительной активации микроглии, и снижали количество микроглиальных клеток, активированных по M1-типу при хронической зависимости от морфина; экспериментальная хроническая зависимость от морфина у мышей снижает количество M2-микроглии во всех исследованных структурах мозга; отдельные миелопептиды (МП1, МП4, МП5) способны повышать количество микроглиальных клеток M2-типа в изученных структурах мозга; МП4 и МП6 увеличивали количество M2-микроглии у зависимых животных, в то время, как при совместном введении морфина с МП1, МП2, МП5 не выявлено изменений в снижении морфином количества M2-активированных микроглиальных клеток. В целом полученные данные подтверждают, что миелопептиды являются регуляторами функциональной активности микроглии.



Рис.1. Сагитальный срез мозга мыши. ОВ – обонятельная луковица, SVZ – субвентрикулярная зона, RMS – ростральный миграционный тракт, ННР – гиппокамп. На увеличенном изображении гиппокампа (вверху справа) красным показана зубчатая извилина DG, поля CA1 и CA3 слоя пирамидных нейронов гиппокампа. Изображение сагитального среза гиппокампа мыши взято с сайта elementry.ru

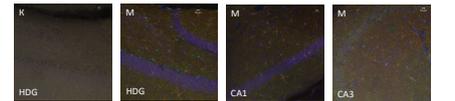


Рис.2. Активация микроглии по провоспалительному типу (M1) в гиппокампе и зубчатой фации мышей с хронической зависимостью от морфина. HDG – хилус и зубчатая фация, CA1 и CA3 – области Аммонова рога гиппокампа. Цвет: антитела к Iba1 – красный, антитела к iNOS – зеленый, DAPI – синий. М – морфин.

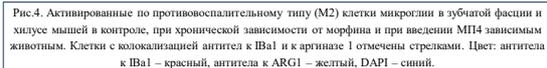


Рис.4. Активированные по противовоспалительному типу (M2) клетки микроглии в зубчатой фации и хилусе мышей в контроле, при хронической зависимости от морфина и при введении МП4 зависимым животным. Клетки с колокализацией антител к Iba1 и к аргиназе 1 отмечены стрелками. Цвет: антитела к Iba1 – красный, антитела к ARG1 – желтый, DAPI – синий.

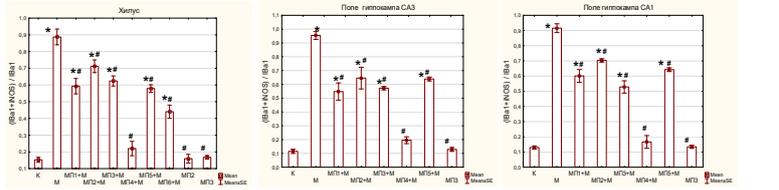


Рис.3. Влияние миелопептидов на количество клеток микроглии, активированных по M1-типу, в гиппокампе и зубчатой фации и хилусе мышей. По оси Y – отношение количества клеток M1-микроглии (колокализация Iba1+iNOS) к общему количеству микроглиальных клеток, выявляемых Iba1, вычисляемое по формуле $(Iba1 + iNOS) / Iba1$. Достоверные отличия: * - от контроля, # - от морфина, $p \leq 0,05$.

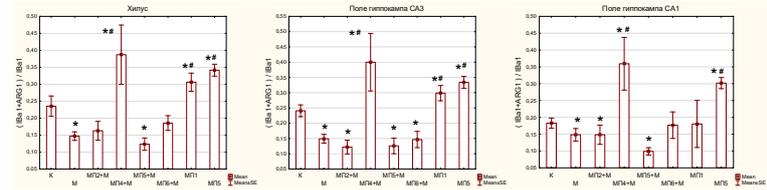


Рис. 5. Влияние миелопептидов на количество клеток микроглии, активированных по M2-типу, в гиппокампе и зубчатой фации и хилусе мышей. По оси Y – отношение количества клеток M2-микроглии (колокализация Iba1+ ARG1) к общему количеству микроглиальных клеток, выявляемых Iba1, вычисляемое по формуле $(Iba1 + ARG1) / Iba1$. Достоверные отличия: * - от контроля, # - от морфина, $p \leq 0,05$.